

Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonları¹

01. Genel Bilgiler

02. İnfeksiyonların Teşhisi

- 02.01. Anamnez
- 02.02. Klinik Bulgular
- 02.03. Otopsi Bulguları
- 02.04. Muayene Maddesinin Alınması
- 02.05. Mikrobiyolojik Muayeneler

03. Bakterilerin İdentifikasyonları

- 03.01. Morfolojik Özellikleri
- 03.02. Kültürel Özellikleri
- 03.03. Fizyolojik Özellikleri
- 03.04. Biyokimyasal Özellikleri
- 03.05. Patojenite ve Toksikite
- 03.06. Antijenik ve Serolojik Özellikleri
- 03.07. Bakteriyofajlara Duyarlılık
- 03.08. Biyoteknolojik Yöntemler
- 03.09. Metabolik Özellikleri
- 03.10. Genetik Özellikleri

04. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi

- 04.01. Kimyasal Seleksiyon Yöntemleri
- 04.02. Fiziksel Seleksiyon Yöntemleri
- 04.03. Biyolojik Seleksiyon Yöntemleri
- 04.04. Dilüsyonla Seleksiyon

01. Genel Bilgiler

Mikroorganizmaların oluşturduğu infeksiyonlarda çoğu zaman gerçek primer etkeni izole etmekte güçlükler çekilir. Çünkü alınan marazi maddelerde, esas etkenin yanı sıra, iki veya daha fazla kontaminant mikroorganizma da bulunabilir (kontaminasyon). Bazı durumlarda da primer etken tarafından başlatılan bir infeksiyona, sonradan ikinci bir patojenik etken daha katılabilir (sekonder infeksiyon). İkinci mikroorganizma, birinci infeksiyonda direnci kırılan konakçı vücuduna, girdikten sonra kolayca çoğalma ve yayılma olanağı bulur. Bunun sonunda, primer etken tarafından oluşturulan infeksiyonun klinik belirtileri yanı sıra, bu defa sekonder infeksiyonun semptomları da ortaya çıkar. Bu durum hastalığın teşhisini daha güç bir hale getirdiği gibi, infeksiyonun seyrinin ve prognozunun da değişmesine ve konakçı aleyhine bozulmasına neden olur. Bazı hastalık olayları da, bir etken tarafından değil de, birden fazla mikroorganizma tarafından oluşturulabilir (ortak infeksiyon).

İnfeksiyon odaklarında bulunan birkaç tür mikroorganizma, birbirlerinin varlığı hallerinde üreme olanağına sahip olabilirler. Diğer bir deyimle, biri diğerinin üremesini teşvik eder ve bu nedenle de karışık bir mikrop florası görülür. Örn, vücuttaki derin ve girintili- çıkıntılı yaralarda aerobik ve anaerobik (*C. tetani*) mikroplar birlikte bulunabilirler.

Yukarıda bildirilen durumlarda, hastalardan veya patolojik maddelerden bir etken yerine birden fazla ve karışık mikroorganizma üretilir. Bu mikropların hangisinin esas hastalığın sebebi olduğunu anlamak veya saptamak çok uzun zaman alır veya imkânsızlaşır. Bu durum, infeksiyonun teşhisini geciktirir ve bazı hallerde de, sağaltıma geç başlanması sonucu

¹ "[Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Prof. Dr. Mustafa Arda. Medisan Yayın Serisi no 46. 2000. Medisan Yayınevi, Ankara](#)" adlı kitabın 28. bölümüdür.

hastanın ölümüne de sebep olabilir. Ayrıca, tedavinin yanlış yapılması neticesi enfeksiyonun kronikleşmesine ve tedavi kabul etmez duruma gelmesine yol açar.

İnfeksiyonun perakut veya akut seyrettiği durumlarda oluşan kontaminasyon veya sekonder enfeksiyonlar kronik olaylara oranla daha azdır. Ekimlerde çok türden mikroorganizmanın üremesini etkileyen diğer önemli faktörler de, ölümden sonra otopsi yapıncaya kadar geçen süre ve alınan marazi madde türü ile çok yakından ilişkilidir.

Hastalık etkenini tanımlama için saf olarak üretmek gereklidir. Bunun için de, izolasyonu şarttır. Etkenin erken izolasyonu, koruyucu ve sağaltıcı gerekli önlemleri zamanında almak bakımından da çok önemlidir.

02. İnfeksiyonların Teşhisi

İnfeksiyonların teşhisinde, genellikle, aşağıdaki sıra izlenmektedir:

02.01. Anamnez

Hastalık ve hasta hakkında, teşhise yönelik çok önemli ipuçları elde etmede, hasta, hasta yakını veya diğer ilişkili kişiler tarafından bilgiler elde etmek ve bunları değerlendirmek, hem klinik teşhise ve hem de laboratuvar muayenelerine bir yön vermesi bakımından önemlidir. Bu nedenle mikrobiyologların çok yönlü araştırması ve bunları değerlendirmesi gereklidir. Bir hastalığın nasıl ve ne zaman başladığı, ne şekilde geliştiği ve seyrettiği hakkında ilk bilgiler teşhis için büyük değere sahiptir. Bunlar, klinik ve otopsi bulguları ile laboratuvar muayeneleri birlikte değerlendirilerek sonuca (teşhise) varılır.

Bazı hallerde, laboratuvara sadece muayene maddesi gönderilir veya getirilir. Bu madde, bunun alındığı hasta ve hastalık (çıkış, seyir; vs.) hakkında da ya getirenden veya gönderilen yerden yeterince bilgi alınmalı ve bunlara dayanılarak laboratuvar muayenelerine bir yön verilmelidir.

02.02. Klinik Bulgular

İnfeksiyon hakkında ilk ve önemli bilgiler hastanın gösterdiği klinik semptomlardan elde edilir. Genel semptomların (iştahsızlık, durgunluk, ateş, terleme, titreme, kabızlık, baş ağrısı, vs.) değeri, özel semptomlar (solunum, sindirim, urogenital, sinir, dolaşım sistemi bozukluklarına ait klinik semptomlar, vs) kadar fazla değildir. Hastalığın teşhisinde özel semptomlar büyük ölçüde yararlı olurlar.

Perakut seyreden vakalarda, genellikle özel semptomlar çok az veya belirsiz olarak ortaya çıkarlar. Bu nedenle perakut olguların teşhisi klinik yönünden güçtür. İnfeksiyonun seyri akut, subakut veya kronik şekilde ise, hastalığı tanımlayan özel klinik belirtiler daha fazla ortaya çıkarlar.

Klinik belirtiler, hasta ve/veya sahibinden alınan bilgiler yanı sıra, hastanın dikkatlice sistematik muayenesi sonunda da önemli ipuçları elde edilebilir. Hasta bireyden, teşhise yardımcı olmak üzere bazı marazi maddeler (kan, biyopsi materyalleri, idrar, kışe, gaita,

ponksiyon sıvıları, yara, lenf düğümü, apse muhteviyatları, omurilik sıvısı, deri kazıntısı, vs.) alınır ve bunlar mikrobiyolojik ve biyokimyasal yönden incelemeye tabi tutulurlar.

Bir enfeksiyona ait tüm semptomları aynı bireyde görmek mümkün olmayabilir. Bu nedenle aynı hastalığa yakalanmış diğer kişiler varsa, bunların da muayeneleri uygun olur ve gerekirse bunlardan da gerekli patolojik maddeler alınır.

Ayrıca hastalar için yapılan fiziksel muayeneler (röntgen, ultrasonografi ve diğerleri), biyokimyasal tetkikler (şeker, lipid, vs.), hematolojik incelemeler ve diğer gerekli yoklama bu hastalığın teşhisine büyük katkıda bulunur.

02.03. Otopsi Bulguları

İnfeksiyonlar sonu ölenlere gerektiğinde hemen ve usulüne uygun olarak otopsi yapılır. Şüphelenilen organlar dikkatlice gözden geçirilir. Ancak, klinik belirtilere göre üzerinde durulan hastalığın yerleşebileceği sistem veya organlar daha titizlikle muayeneye tabi tutulur. Görülebilen lezyonların yeri, büyüklüğü, şekli ve diğer özellikleri kaydedilir. Patolojik bulgulara göre hastalık hakkında tamamlayıcı bilgiler elde edilir.

Alınan marazi maddelerin histopatolojik yönden muayeneleri uzman kişiler tarafından yapılarak topluca bir değerlendirmeye gidilir.

02.04. Muayene Maddesinin Alınması

İnceleme amacı ile alınacak maddeler, hasta canlı iken (biyopsi) veya öldükten sonra (otopsi materyali) alınırlar. Hastalığın karakterine, yerleştiği organa ve etkenin vücuttan dışarı çıkma durumuna göre materyaller değişebilir.

1- Muayene maddeleri çok taze olmalı ve yeteri miktarda alınmalıdır.

2- Hastadan, ateşli dönemde materyal alınması tercih edilmelidir. Çünkü kanda fazla miktarda etkene rastlamak mümkündür. Ateşli durumda iken genellikle kan alınarak hemokültürler yapılır. Virolojik yönden de ekimler uygulanır. Kanda bulunan etken, kan aracılığı ile bütün dokulara veya organlara yayılma olanağı bulur. Kronik devrede ise, genellikle, kanda mikroorganizma yoktur. Etkenler doku ve organlara yerleşir ve burada da bozukluklar meydana getirirler. Hastalık etkenleri vücuttan çeşitli sekret (süt, sperma, tükürük, v.s.) ve ekskretlerle (idrara, gaita, kraşe, burun akıntıları, uterus akıntıları, v.s.) dışarı atılırlar. Bu nedenle bu maddelerden yeterince alınarak gerekli muayeneler ve ekimler uygulanır. Bazı durumlarda materyalleri (idrara, süt, gaita, kan, v.s.) gün aşırı veya belli periyotlarla almak uygun olur.

3- Ölüm olgularında, hemen ve zaman geçirmeden (gerekli ise) şüphelenilen veya lezyonlu doku ve organlardan aseptik koşullarda ve yeterince marazi maddeler alınır.

4- Materyaller antibiyotik veya kemoterapötik maddelerin tatbik edilmediği hastalardan veya antibiyotik tatbikinden önce alınmalıdır. Eğer antibiyotik uygulanmışsa, vücuttan atılma süresini bekleyip ondan sonra materyal alınmalıdır.

5- Muayene maddelerinin, eğer mümkünse, birkaç hastadan alınması, etken izolasyon şansını arttırabilir.

- 6- Muayene maddeleri aseptik koşullarda alınmalı ve steril kaplara konarak hemen soğukta muhafaza edilmelidir.
- 7- Materyaller alındıktan sonra, laboratuvar yakınsa, vakit kaybetmeden, laboratuvara göndermelidir. Eğer, laboratuvar uzaksa, dondurulduktan sonra termoslar içinde en seri vasıta ile sevk edilmelidirler.
- 8- Laboratuvarda aynı gün ekimi yapılamayacak olanlar -20°C. de muhafaza edilirler.
- 9- Alınan kanların usulüne uygun olarak serumu çıkarılır ve gönderilir. Eğer isteniyorsa sitratlı kan veya serumu çıkarılmamış kan da gönderilebilir.
- 10- Gerek görülüyorsa, kandan frotiler yapılarak muayene için laboratuvarlara gönderilebilir.
- 11- Apse, lenf düğümü yara, v.s. muhteviyatları, deri kazıntıları, süt, sperma, ponksiyon sıvıları, v.s. de usulüne uygun olarak alınır ve en seri vasıta ile laboratuvara gönderilir.
- 12- Bakteriyolojik, mikolojik ve virolojik yoklamalar için kullanılan muhafaza kaplarının steril olması gereklidir. Muayene maddesi almak için makas, bisturi ve penslerin de aynı şekilde kaynatılarak sterilize edilmesi ve soğuduktan sonra kullanılması uygundur.
- 13- Alınacak materyalin türü, hastalıkların karakterine göre değişir.

02.05. Mikrobiyolojik Muayeneler

Hastalık etkenlerinin direkt ve indirekt teşhislerinde mikrobiyolojik muayenelerinin önemi çok fazladır. Klinik ve otopsi bulguları ile laboratuvar muayeneleri sonucunda elde edilen bilgiler, birleştirilerek kesin teşhise gidilir. Laboratuvara, gönderilen muayene maddelerinin çeşitli yönlerden (bakteriyolojik, mikolojik, viralolojik, serolojik muayeneleri yapılarak sonuca varılır. Laboratuvar muayeneleri aşağıdaki tarzda uygulanır.

Mikrobiyolojik tanı yöntemlerini başlıca 8 kısımda incelemek mümkündür. Bunlar da,

- a) Bakteriyolojik tanı yöntemleri
- b) Mikolojik tanı yöntemleri
- c) Virolojik tanı yöntemleri
- d) Parazitolojik tanı yöntemleri
- e) İmmunolojik ve serolojik yoklamalar
- f) Faj testleri
- g) Deney hayvanlarına inokulasyon
- h) Biyoteknolojik tanı yöntemleri

Ancak, burada konu bakteriyoloji olduğundan sadece bakteriyolojik tanı yöntemlerinden bahsedilecek, diğerleri ise kendi konularında izah edilecektir.

1- Bakteriyoskopi

Gönderilen biyopsi ve/veya otopsi materyallerinden usulüne uygun olarak ince preparatlar hazırlanır ve basit (metilen mavisi, bazik fuchsin, vs.) veya bileşik boyama (Gram, Ziehl Neelsen, Giemsa, vs.) yöntemlerinin biriyle boyanırlar. Boyama yöntemleri, şüphelenilen hastalığa göre değişebilir. rn, tuberküloz, leptospira, klamidia, ve pastrella infeksiyonlarında özel boyama teknikleri kullanılır. Diğer infeksiyon etkenleri için Gram boyaması genellikle yeterlidir.

Hazırlanan frotilerin birkaç tane olması ve çok ince hazırlanması etkeni görme şansını arttırabilir. Ancak, frotilerde spesifik etkene rastlamak çok nadir olduğu gibi, genellikle

karışık mikroplar ihtiva eden mikroskopik sahaya rastlanabilir. Böyle hallerde gerçek etkeni, tanımak çok zor veya imkânsızdır.

Bazı durumlarda şüphelenilen spesifik etkeni görmek mümkündür. Ancak, kesin karar vermek yerine daha dikkatli bulunarak, diğer laboratuvar muayenelerinin teyit edici sonuçlarını beklemek yerinde ve iyi bir tedbir olur. Frotelerde rastlanan spesifik etkene benzeyen birçok saprofit karakterdeki mikroorganizmalar bulunabilir. Bunu hatırdan çıkarmamak gereklidir. Örn, kraşede rastlanan asido-rezistans mikroplar için, hemen hastaya veremli teşhisi konmamalıdır. Rastlanan bu etkenler saprofit mikobakteriler olabilirler. Bu örnekleri daha da genişletmek mümkündür.

Mikolojik yönden muayene için alınan kıl, deri kazıntıları v.s. kendine özel yöntemlerle incelemeye tabi tutulur (natif olarak) ve gerekirse lakto fenol pamuk mavisi ile de boyanarak tetkik edilirler. Elde mevcut konjugatlar var ise, fluoresens antikor tekniğinden de yararlanılır.

Yukarıdaki nedenler gereğince, bakteriyoskopi ile kesin teşhis koymamalı, araştırmaları daha ileri safhaya götürmeli ve laboratuvar çalışmalarına, o hastalık üzerinde daha fazla durulması bakımından, yön vermelidir.

2- Kültür

Gönderilen muayene maddelerinden, araştırılması istenen hastalık yönünden, normal veya özel katı ve sıvı besiyerlerine ekimler yapılır. Kültürler optimal ısı derecesinde ve araştırılan hastalık etkeninin karakterine göre, aerobik, mikroaerofilik veya anaerobik koşullarda uygun bir süre inkubasyonda bırakılır. İnkubasyon süresi tuberküloz etkenleri için 20-35 gün arasında değişir.

Balık hastalıklarında, patogenik mikroorganizmalar için özel besi yerleri kullanılır ve inkubasyon sıcaklığı da 20-25 °C ler arasındadır. Mikotik infeksiyonlar için de, genellikle, Sabouraud dekstroz agar, Litman oxgall ve diğer katı besiyerleri çok kullanılır. Bunlarda da optimal üreme sıcaklığı 20-25 °C olup kültürler 15 gün kadar inkubasyonda bırakılırlar.

Bazı hastalık etkenleri için canlı ortamlardan yararlanılır. Örn, rickettsia, klamidia ve viral etkenler için embriyolu yumurtalar ve deneme hayvanları çok işe yararlar. Doku kültürleri, genellikle virus izole etmek, üretmek ve çeşitli serolojik, vs. testler yapmak için tercih edilirler.

Bazı hastalıklarda zenginleştirme besi yerleri ve bundan sonra özel selektif ve diferensiyel ortamlar kullanılır. Örn, *Salmonella* izolasyonları için, selenit besi yeri böyle karaktere sahiptir.

Katı besi yerlerinde hastalık etkenini üretmek ve izole etmek için, ekim veya özel yayma teknikleri kullanılmalı ve mümkün olduğu kadar mikroorganizma tek olarak düşürülmelidir. Mikrop izolasyonları katı ortamlarda yapıldığından, bu besiyerlerinin istenen mikroorganizmayı en iyi şekilde üremesini sağlayacak, buna karşılık istenmeyenlerin üremesini sınırlayacak veya üretmeyecek durumda olması arzu edilir. Bu nedenle çeşitli hastalık etkenleri için optimal üreme sağlayacak özel selektif katı besiyerleri yapılmıştır. Katı veya sıvı besi yerlerine, genellikle, Lezyonların bulunduğu yerden ve kenarlarından alınan maddeler ekilirler.

Hastalık etkenlerinin yüksek oranda izole şansını artırmak için, her hastalıkta özel uygulanan izolasyon teknikleri vardır. Bunlar yakından izlenmelidirler. Uygun bir süre inkubasyonda kalan, katı besi yerlerinde üreyen koloniler, o hastalık etkeni yönünden, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, serolojik ve patogenite testlerine tabi tutulmalıdırlar.

3- Deneme hayvanı inokulasyonu

Muayene maddelerinden yapılan suspansiyonlardan veya besi yerlerinde üreyen şüpheli kolonilerden duyarlı deneme hayvanlarına şırıngalar yapılır. Bu amaçla fare, kobay, tavşan, tavuk, vs. fazla kullanılır. Deneme hayvanlarının ve inokulasyon yollarının seçimi, araştırılan hastalığa göre değişir.

Deneme hayvanlarının sıhhatinin ve kondisyonunun şırıngadan önce normal olması şarttır. Spontan bir infeksiyona sahip olmama, ekto- ve endo parazitlerden de yoksun olmalıdır. Kanlarında herhangi bir antikor da ihtiva etmemelidir. Konvansiyonel hayvanların teşhis veya izolasyon amacıyla kullanılması, yukarıda bildirilen nedenlerle, sakıncalıdır. Bu amaçla en iyisi specific pathogen free (SPF) deneme hayvanı kullanmaktır.

İnokule edilen hayvanlar cereyansız, temiz ve iyi bir yere konurlar ve normal bakıma alınırlar. Hastalık yönünden her gün durumları kontrol edilir. Ölenler olursa otopsi yapılarak lezyonların lokalizasyonuna ve patolojik bozukluklara dikkat edilir. Gerekli materyaller alınarak boyamalar ve ekimler yapılır ve mikrop izole edilmeye çalışılır. Gerekliyse, canlı kalanlardan belli bir süre sonra kan alınır ve serolojik yoklamalar uygulanır. Bazı durumlarda da deneme hayvanı uygun bir süre sonra öldürülerek otopsi yapılır, patolojik bozukluklar incelenir, materyaller alınır ve ekimleri yapılır.

4- Serolojik ve alerjik testler

Hastalığın indirekt teşhisi yönünden uygulanan serolojik muayeneler çok faydalı olmaktadır. Hasta hayatta iken alınan kan serumları vasıtasıyla birçok hastalıklar teşhis edilebilmektedir. Brucellosis, malleus, paratuberculosis, leptospirosis, salmonellosis, listeriosis, vibriosis v.s. gibi hastalıklarda genellikle aglutinasyon ve komplement fikzasyon testleri uygulanır. Viral hastalıklarda da hemaglutinasyon, hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) ve nötralizasyon testleri fazlaca kullanılır.

Presipitasyon (sıvı veya katı ortamlarda) testleri de, etkenlerin karakterlerine göre laboratuvarlarda uygulanabilirler.

Katı besiyerlerinde üreyen kolonilerle lâm üzerinde yapılan çabuk aglutinasyon testleri, etkenin teşhisine büyük ölçüde yardımcı olur.

Hastalıkların türüne göre kullanılmak üzere diğer birçok ileri serolojik yöntemler daha bulunmaktadır (ELİSA, RIA, IFA, vs.). Bunlar da aynı şekilde yararlar sağlayabilirler.

Alerjik reaksiyonlardan Veteriner hekimlikte özellikle malleus, tuberkülozis ve paratuberkülozisin indirekt teşhisinde fazlaca yararlanır. Reaksiyon için özel alergenler (mallein, tuberkülin, johnin PPD) kullanılır.

İnsan hekimliğinde alerjik testler infeksiyon hastalıkları yanı sıra, diğer alergenlerden ileri gelen hastalıklarda da kullanılmaktadırlar (Hipersensitivite reaksiyonları).

03. Bakterilerin İdentifikasyonları

03.01. Morfolojik Özellikleri

Bakterilerin bireysel morfolojileri boyutlarının çok küçük olmaları nedeniyle ancak mikroskoplar (ışık mikroskobu, karanlık saha, faz kontrast, elektron mikroskop, vs.) altında gözlenerek, saptanabilir. Bu amaçla, uygun sıvı veya katı ortamlarda saf olarak üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar özel boyalarla boyanarak incelenirler. Mikroskop altında, bakterilerin bireysel formları (yuvarlak, oval, kokoid, çomak, kokobasil, virgül, spiral, pleomorfik, vs.), büyüklüğü (küçük, büyük, vs.), kenarları (düz, köşeli, eğri, paralel, vs.), dizilişi (küme, zincir, filament, vs.), spor durumu (var veya yok, varsa terminal, subterminal, sentral, lateral, vs.), granül (var veya yok), boyanma özelliği (Gram negatif veya pozitif, asido rezistans, homojen boyanma, vs.), flagella ve fimbria muayeneleri, vs. çok iyi incelenir.

Ayrıca, taze sıvı ortamlardan hazırlanan natif preparatlarla da hareket muayenesi yapılabilir. Bu muayene de aynı zamanda hem morfolojileri ve hem de hareketli olup olmadıkları hakkında bir fikir elde edilebilir.

03.02. Kültürel Özellikleri

Bakterilerin kültürel özelliklerini incelemede, bunların katı ve sıvı ortamlardaki saf kültürleri kullanılır.

a) Katı ortamlarda koloni morfolojileri: Bakterilerin büyük bir bölümü (rickettsia ve Chlamydia'lar hariç) katı ve sıvı ortamlarda, aerobik, anaerobik, mikroaerofilik koşullarda üreyebilme yeteneğine sahiptirler.

Bakteriler uygun bileşimdeki veya zenginleştirilmiş (%8 kan+%0.1 glikoz +%0.1 yeast ekstrakt veya diğer maddelerle) katı besi yerlerinde, uygun bir inkubasyon sıcaklığı ve süresinden sonra gözle görülebilecek büyüklükte koloniler meydana getirirler. Bakteriler arasında yer almasına karşın, rickettsia ve chlamydia'lar cansız ortamlarda üreyemezler. Bunları üretmede deneme hayvanları, doku kültürleri veya embriyolu yumurtalar kullanılırlar. Bakterilerin katı ortamlarda oluşturdukları kolonilerin, büyüklüğü, morfolojik ve yapısal özellikleri ayrıntılı olarak incelenir. Göz ve stereoskopik mikroskopta yapılan muayenelerde kolonilerin S,R,M,L formları, rengi, kokusu, homoliz durumları ve diğer morfolojik özellikleri ayrıntılı olarak gözlenir ve belirlenir.

Bazı bakteriler aerobik koşulları, diğerleri ise anaerobik veya mikroaerofilik ortamları sever ve böyle şartlarda üreme gösterirler.

Bazı bakteriler 18-24 saatte (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, vs.), bir bölümü 2 günde; streptokok, korinebakteri brusellalar, 4-5 günde; Mycoplasma, 6-10 günde; veya mikobakterilerde olduğu gibi 20-30 günde gözle görülebilir koloniler oluştururlar. Katı besi yerinde oluşan koloniler ne kadar seyrekse o kadar fazla gelişirler. Buna bağlı olarak da koloni çapı büyür.

Mezofilik bakterilerin üremesi 35-38 °C dereceleri arasında iyi olmasına karşın balık patojen'leri (psikrofilik'ler) genellikle 20-35 °C arasında, buna karşın ısıya memelilere oranla daha yüksek olan kanatlılara ait etkenler de 38-40 °C 'ler arası bir üreme gösterirler. Termofilikler ise 45-60 °C 'ler arasında kolayca gelişebilirler.

Aerobik mikroorganizmalar normal atmosferdeki O₂ 'de, anaerobikler oksijensiz ve mikroaerofilikler ise %10 CO₂ 'li ortamlarda daha iyi ürerler. Fakültatifler ve aerotolerantlar ise her koşulda üreme gösterebilirler.

b) Sıvı ortamda üreme özellikleri: Uygun sıvı besi yerlerinde bakteriler, belli bir süre sonra, bol, zayıf veya orta derecede bir üreme yeteneğine sahiptirler. Bazıları üstte pellikül, dipte tortu, saç gibi, veya granüllü bir üreme gösterirler. Üremenin türleri besi yerinin bileşimi, inkubasyon sıcaklığı ve süresine bağlı olduğu gibi, o türün genetik bir karakteridir.

Besiyerine katılan bazı maddeler (pepton, serum, kan, glikoz, maya ekstraktı (veya maya otolizati) ve diğer bazı maddeler de üreme üzerine olumlu yönde etkiye sahiptirler.

03.03. Fizyolojik Özellikleri

Bakterilerin cinslerine göre fizyolojik karakterleri de değişmektedir. Üreme ısıları, inkubasyon süreleri, oksijene ihtiyaç durumları, besi yerinin bileşimi ve diğer fizyolojik özelliklerinin araştırılması ve saptanması gereklidir.

03.04. Biyokimyasal Özellikleri

Mikroorganizmaların identifikasyonlarında biyokimyasal aktivitenin belirlenmesinin önemi çok fazladır. Bu amaçla, çok değişik testler kullanılır. Bunlar arasında, karbonhidrat fermantasyonu, H₂S, indol, MR, VP, sitrat, nişasta, jelatin, üre, katalaz, oksidaz, koagülaz vs. gibi testler, mikroorganizmaların türüne göre seçilerek kullanılır.

03.05. Patojenite ve Toksikite

Bakterilerin hastalık oluşturma yetenekleri bunlarda bulunan virulens faktörleri ile yakından ilişkilidir. Virulens faktörleri patojenik ve toksijenik özelliklerini de kapsamaktadır. Bu karakterler de, genellikle, deneme hayvanları, embriyolu yumurta ve hücre kültürlerinde yapılan denemelerle ortaya konulabilir.

Başlıca virulens faktörleri arasında adhezinler, (fimbrialar dâhil) ekzotoksinler, toksik substanslar, kapsül, endotoksin, çeşitli enzimler, homolizinler vs. bulunmaktadır.

Bazı bakterilerin virulensleri, taşıdıkları plasmid ve faja bağımlıdır. Bazılarında da bu karakterler kromozomal bir özellik taşır.

03.06. Antijenik ve Serolojik Özellikleri

Bakteriler, kendilerinin çeşitli yerlerine lokalize olmuş ve yapısal bir karakter taşıyan değişik antijenik substanslara sahiptirler. Bunların başlıcaları arasında, kapsül, mikrokapsül, pilus, flagella, hücre duvarı, sitoplasmik membran, spor ve diğer komponentler sayılabilir. Bunların bir bölümü protein ve polisakkarid, diğerleri de kompleksler (glikoprotein, lipopolisakkarid, lipoprotein, vs.) halindedirler.

Toksijenik olanlarda da toksin ve toksik metabolitler antijenik özelliktedirler. Bakterilerin antijenik substansları vücutta antikor sentezini uyardıklarından serolojik tiplendirmede de önemli rol oynarlar. Bu amaçla çeşitli serolojik testler (CF, SAT, ELİSA, RIA, FA, AGP, peroksidase, vs.) kullanılabilir.

03.07. Bakteriyofajlara Duyarlılık

Bakteriyofajlar hem izolatların tiplendirilmesinde ve hem de klasifikasyonunda yardımcı olur. Eğer mevcut spesifik fajlar varsa, bunlardan yararlanılarak teşhise katkıda bulunulur. Ancak fajla teşhis ikinci derecede düşünülmelidir. Çünkü, aynı tür içinde bile spesifik faj'a karşı hem duyarlı ve hem de duyarsız olanlar çıkabilir.

03.08. Biyoteknolojik Yöntemler

İzolatların kesin teşhisinde ileri tekniklerden olan hibridizasyon yöntemleri (Southern blot, Northern blot, dot blot, vs.) ve diğer ileri teknikler kullanılabilir. PCR ile birleştirilen teknikler son zamanlarda fazla kullanılmaktadır.

03.09. Metabolik Özellikleri

Bakterilerin sentezlediği ekzo-ve endoenzimlerin ve diğer çeşitli metabolitlerin türü, miktarı, etkinliği ve yapısı birbirlerinden farklar gösterirler. Mantarlar da birçok enzim ve değişik sekonder metabolitler sentezler ve bunlar da türler arasında farklar gösterir.

03.10. Genetik Özellikleri

Bakterilerin genetik materyalleri, kompozisyon bakımından farklar gösterirler. Türler arasında baz sırası ve sayısı hemen hemen aynı ve sabit olmasına karşın, aynı cinsin farklı türleri arasında da değişiklik bulunmaktadır. Özellikle, G+C oranının % olarak değeri türler arasında ayırıcıdır.

Genetik yönden yakınlıkları saptamada DNA'daki baz homologluk oranının belirlenmesi önem taşır ve bu hibridizasyon yöntemleri ile belirlenir.

Bakterilerin bazılarında bulunan plasmid, transpozon ve İS-elementleri de bakterilere bazı özellikler kazandırır (antibiyotiklere dirençlilik, antijenik özellikler, virulens faktörleri, vs.)

04. Saf Kùltürlerin Elde Edilmesi

Doğada mikroorganizmalar, (su, gıda, toprak, hava, canlılarda, vs.), genellikle, birçok cinse ait türlerinden oluşan popülasyonları halinde ve birlikte bulunurlar (koekzistens). Tek tür mikroorganizmaya rastlamak nadirdir. Her ne kadar tek bir etken tarafından oluşturulan hastalık olgularından saf kùltürler elde etmek mümkünse de bazı vakalarda koinfeksiyon veya sekonder infeksiyonlar nedeniyle karışık mikroflora ile karşı karşıya gelinir. Böyle durumlarda primer etkenin izolasyonu ve saf olarak kùltürünün elde edilmesi oldukça zordur. Bu amaçla selektif yöntemlerden yararlanılabilir.

Bu özel teknikler, arzu edilen mikroorganizmanın ya fazla üremesini sağlarlar veya diğer istemeyenlerin üremesini kısıtlarlar veya önlerler. Bazı durumlarda, esas primer etken de diğer mikroorganizmaların bulunmaması nedeniyle, zayıf bir üreme gösterebilir. Çünkü, bu tür mikroorganizmalar, gelişmek ve üremek için diğerlerinin çok özel metabolitlerine muhtaçtırlar.

Saf kùltürler, aynı zamanda, mikroorganizmaların identifikasyonları için gerekli testlerin yapılması için de çok lazımdırlar. Arzu edilen bakterinin üremesini sağlamak için kimyasal, fiziksel ve biyolojik selektif yöntemlerden yararlanılabilir.

04.01. Kimyasal Seleksiyon Yöntemleri

Besi yerlerine bazı kimyasal maddeler katarak sadece istenilen mikroorganizmanın gelişmesi ve üremesi sağlanabilir. Bunlardan biri, o mikroorganizmanın özel gereksinim duyduğu bir veya birkaç kimyasal madde besiyerine katılarak, onun fazlaca üretilmesi elde edilebilir. Bu da karbon, nitrojen veya diğer kaynaklardan birinin kullanılması ile mümkündür. Özel maddelerle zenginleştirilmiş besiyerleri bu amaç için oldukça fazla yararlar sağlarlar.

Bazı durumlarda da arzu edilen mikroorganizmanın gelişmesine ve üremesine yardımcı olan, buna karşın diğerleri için inhibitör veya öldürücü olan çeşitli maddeler kullanılabilir. Bu amaçla boyalar, safra tuzları, ağır metal tuzları, antibiyotikler, antiseptikler, antibakteriyel veya antifungal diğer kimyasal maddelerden yararlanılabilir. Örn, birçok Gram negatif bakteri, Gram pozitiflerin üreyemedikleri yoğunluktaki boya konsantrasyonuna sahip olan besiyerlerinde kolayca üreyebilirler. Birçok enterik bakteri deoxycholate (safra tuzu) içeren besiyerinde gelişmesine karşın Gram pozitifler bu maddenin belli yoğunluğunda inhibe olurlar. Bu amaçla MacConkey agar fazlaca kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyeri Gram negatif intestinal mikroorganizmaların üremesini kolaylaştırır.

Antibiyotikler veya çeşitli kemoterapötikler ve boyalar (kristal violet, malaşit yeşili, vs.) aynı amaç için kullanılan maddeler arasındadır. Bu amaçla içlerinde antibiyotik veya boyalar bulunan bir çok selektif ortam bulunmaktadır.

04.02. Fiziksel Seleksiyon Yöntemleri

Seleksiyon için fiziksel yöntemlerin başında ısı gelmektedir. Eğer, karışık kùltürlerden spor verenlerin ayrılması isteniyorsa, o zaman kùltürler 80°C'de 10 dk. ısıtıldıktan sonra özel besiyerlerine ekimler yapılır. Bu kısa süreli yüksek ısıtmada sporeler hariç olmak üzere vejetatif formlar genellikle ölürler.

Eğer, termofilik'lerin izolasyonu isteniyorsa kültürler 55°- 65° C'ler arasında 15-20 dakika ısıya maruz bırakılabilirler. Psikrofilikler için ise düşük ısı kullanılabilir. Ancak, bu ısıda, mezofilikler üremeyebilirler ve fakat ölmezler. Bu nedenle dikkatli olmak gerekir. Besi yerlerinin pH'sı da seleksiyon için kullanılabilir. Birçok patojenik mikroorganizma, konakçının vücudundaki pH'ya uygun sınırlar içinde gelişebilirler (pH 7.0-7.4). Bu limitlerin dışında üremeler sınırlanır. Bazı mikroorganizmalar hafif asit (pH. 6-6.5) olan ortamda bir kısmı da hafif alkali olan bir besi yerinde daha kolay gelişebilirler (pH 8.0-8.5). V.cholera, PPLO'lar vs. alkali ortamlarda daha iyi ürerler. Filtrasyon virusları bakterilerden ayırmada ve kontaminasyonları önlemede çok fazla kullanılmaktadır. Belli porositede olan membran filtreler (0.2 mm çap) bakterileri tutar, ancak virusları geçirir.

04.03. Biyolojik Seleksiyon Yöntemleri

Deneme hayvanları (fareler, kobaylar, vs.) miks kültürlerden istenilen mikroorganizmayı ayırmada kullanılabilirler. Nonpatojenikler elimine olurken, patojenik olanlar hayvanlarda hastalık meydana getirir. Hayvanlara derialtı verilen doku homojenat veya karışık kültürler, mikroorganizmanın türüne göre değişmek üzere, belli bir süre sonra kalpten kan alınarak hemokültür yapılır ve besi yerlerine ekilerek saf etkenler elde edilir.

04.04. Dilusyonla Seleksiyon

Karışık kültürler dilue edilerek uygun katı besi yerlerine ekimler yapılır ve üreyen koloniler arasından istenilen etkene ait olanlar seçilerek saf kültürleri elde edilir. Yukarıda belirtilen yöntemlerden en uygun olanı seçildikten sonra üretilen mikroorganizmalardan tek koloni alınarak uygun sıvı ve katı besi yerlerinde saf kültürleri yapılır ve çeşitli yöntemlerle identifikasyonlarına çalışılır.

Buraya kadar açıklanan tekniklerin yanı sıra, çok yeni ve özel yöntemler de kullanılabilir. Bunlar da kesin teşhise çok yardımcı olurlar.